

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 7月16日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-206356

[ST.10/C]:

[JP 2002-206356]

出 願 人

Applicant(s):

日清紡績株式会社

2003年 6月 3日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3043209

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-9938

【提出日】 平成14年 7月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 マイクロアレイの作製方法

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社
研究開発センター内

 【氏名】 莊司 友聡

【特許出願人】

 【識別番号】 000004374

 【氏名又は名称】 日清紡績株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089244

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

 【識別番号】 100090516

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

 【識別番号】 100100549

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 川口 嘉之

 【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロアレイの作製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 マイクロピペットを有し、少なくともこのマイクロピペットの支持及びマイクロピペットに収容した液状の試料の注出、の各操作を自動的に行う自動注出装置を用いて、生体物質を含有する液状の試料を撥水性の基材に付着させ、付着させた試料を乾燥させて前記生体物質を前記基材に固定化するマイクロアレイの作製方法において、

前記マイクロピペットから所定量の前記試料を注出してマイクロピペットの注出口に試料の液滴を形成する工程と、

前記注出口に形成された液滴が前記基材に接する位置に前記マイクロピペットを支持する工程とを含み、

前記注出口に形成した液滴を前記基材に移行させることにより前記試料を基材に付着させることを特徴とするマイクロアレイの作製方法。

【請求項 2】 前記自動注出装置には複数の前記マイクロピペットを有する自動分注装置を用い、前記基材の複数箇所に前記試料を付着させることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロアレイの作製方法。

【請求項 3】 一の前記マイクロピペットから 0.5～2.0 μ L の前記試料を注出して前記液滴を形成することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のマイクロアレイの作製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マイクロアレイの作製方法に関し、特にマイクロピペットを有する自動注出装置を用いて、目視で容易に確認できるスポットを形成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

特異的な反応により検出可能な生体物質の検出には、一方の生体物質を基材表

面の複数箇所に固定したマイクロアレイが従来より用いられている。このようなマイクロアレイの作製方法としては、例えばマイクロピペットを複数有する分注装置を用いる方法が知られており、このような分注装置を用いるマイクロアレイの作製方法としては、例えば特開 2 0 0 1 - 3 3 7 0 9 6 号公報に開示されている分注装置及び DNA チップ（DNA マイクロアレイ）の作製方法が知られている。

【 0 0 0 3 】

この分注装置及び DNA チップの作製方法において、分注装置には、少なくとも一個以上の基体に、外部から試料溶液を注入するための注入口と、試料溶液が注出・充填されるキャビティと、試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、キャビティを構成する基体の少なくとも一壁面に圧電／電歪素子を備え、キャビティ内において試料溶液が移動するように構成されたマイクロピペットを複数配列された構成され、マイクロアレイの注出口に情報に突出するピンが設けられている分注装置が用いられる。また、DNA チップの作製方法では、この分注装置を用いて試料溶液を吐出させてマイクロアレイを作製するが、試料溶液の補給は、分注装置の上方に、溶液溜め部が多数配列されたカートリッジを位置させ、各溶液溜め部にピンで孔を開けて、溶液溜め部中の溶液を注入口に導入することにより行われる。前記分注装置及び DNA チップの作製方法は、微小スポットを高精度かつ高速に形成し、各マイクロピペットへの溶液の供給を迅速かつ効率的にかつ確実にを行い、溶液の供給から基板上への供給までの工程をスムーズに行う上で優れている。

【 0 0 0 4 】

微小スポットが形成されているマイクロアレイでは、目視によるスポットの確認が困難であることから、このようなマイクロアレイを用いた生体物質の検出では、蛍光標識法を採用し、これを蛍光スキャナで検出することが一般的である。例えば DNA の検出では、Cy 3 や Cy 5 等の蛍光物質で標識した PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）産物をハイブリダイズさせ、蛍光スキャナで検出する。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

一方で、マイクロアレイを用いた生体物質の検出では、例えば有色の標識を用いて、目視で検出することにより行われる方法が知られている。この検出方法は、検出機器を必要とせず、容易に検出結果を得る上で優れた方法である。例えばDNAの検出では、ビチオン標識したPCR産物をハイブリダイズさせ、Streptavidin-HRP（ストレプトアビジン-西洋わさび過酸化酵素）とTMB（テトラメチルベンジジン）を用い、発色の有無を目視で検出する。しかしながら、微小スポットが形成されているマイクロアレイでは、スポットが微小であることから目視での確認が困難であり、有色の標識を用いる検出方法を採用することが困難である。

【0006】

一方で、前述した特開2001-337096号公報には、複数の微小スポットを合体させることにより大きな一つのスポットを形成する方法が開示されている。しかしながらこのような方法では、試料を複数回にわたって付着させることにより複数の微小スポットを形成することから、最終的に形成されるスポットを形成するのに、より多くの試料及び時間を要する。

【0007】

本発明は、マイクロピペットを有し微小なスポットを形成できる自動注出装置を用いて、容易に目視できる大きさのスポットを一滴の試料で形成することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、前記課題を解決するための手段として、生体物質の検出に使用され得る自動注出装置を用い、数 μ L程度の試料を基材に点着して直径1mm以上のスポットを形成することができる方法を提供する。

【0009】

すなわち本発明は、マイクロピペットを有し、少なくともこのマイクロピペットの支持及びマイクロピペットに収容した液状の試料の注出、の各操作を自動的に行う自動注出装置を用いて、生体物質を含有する液状の試料を撥水性の基材に付着させ、付着させた試料を乾燥させて生体物質を基材に固定化するマイクロア

レイの作製方法において、マイクロピペットから所定量の試料を注出してマイクロピペットの注出口に試料の液滴を形成する工程と、注出口に形成された液滴が基材に接する位置にマイクロピペットを支持する工程とを含み、注出口に形成した液滴を基材に移行させることにより試料を基材に付着させるマイクロアレイの作製方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

本発明におけるマイクロアレイの作製方法は、マイクロピペットを有し、少なくともこのマイクロピペットの支持及びマイクロピペットに収容した液状の試料の注出、の各操作を自動的に行う自動注出装置を用いて、生体物質を含有する液状の試料の液滴をマイクロピペットの注出口に形成し、マイクロピペットを適切に支持し、注出口に付着してる状態の液滴を撥水性の基材に付着させ、注出口から基材に液滴を移行させる。本発明によれば、試料の注出量及びマイクロピペットの支持位置を調節することにより、形成されるスポットの径を目的の応じて自在に設定することができる。

【 0 0 1 1 】

本発明に用いられる自動注出装置は、マイクロピペットを有し、少なくともこのマイクロピペットの支持及びマイクロピペットに収容した液状の試料の注出、の各操作を自動的に行う装置である。本発明では、自動注出装置に備えられるマイクロピペットの数は特に限定されないが、マイクロタイタープレートを用いる生体物質の検出で通常使用される、マイクロピペットを複数有する自動分注装置を用いることが好ましい。マイクロピペットは、適当量の試料を注出することができれば特に限定されず、公知の様々なマイクロピペットを用いることができる。このようなマイクロピペットとしては、例えば前述した特開 2 0 0 1 - 3 3 7 0 9 6 号公報に開示されている構造のマイクロピペットや、先端に注出口を有するノズルを備えたマイクロピペット等が挙げられる。

【 0 0 1 2 】

マイクロピペットを複数有する前記自動分注装置は、マイクロピペットの支持及びマイクロピペットによる注出だけでなく、例えばマイクロピペットへの注入

やマイクロピペットの洗浄、及びロボットアームによるマイクロアレイの搬送や洗浄等の、様々な操作を自動的に行える装置であることがより好ましい。このような自動分注装置としては、マイクロタイタープレートを用い、マイクロタイタープレートの各ウェルへの試料の供給から検出反応までの操作を自動的に行う自動分注装置を適用することが可能である。このような自動分注装置としては、例えばパーキンエルマーライフサイエンス社製マルチプローブIIが挙げられ、このような自動分注装置を用いることにより、マイクロアレイの作製から生体物質の検出までの検出操作全体において人的ミスを防止でき、再現性が良く信頼性の高い検査を実施することが可能となる。

【 0 0 1 3 】

本発明に用いられる試料は、生体物質を含有する液状の試料であれば特に限定されない。生体物質としては、マイクロアレイを用いて通常検出されるような特異的な反応を生じる物質であれば良く、例えば核酸、たんぱく質、糖、脂質等が挙げられる。また生体物質は、検出しようとする未知物質であっても良いし、未知物質を検出するための既知物質であっても良い。また試料には、生体物質の化学的な性状を調整するための緩衝液等の調整剤や、試料の物性を調整するための増粘剤等の添加剤を適宜配合することができる。

【 0 0 1 4 】

本発明に用いられる基材は、撥水性を有するものであれば特に限定されない。基材の撥水性は、基材上のスポットに表面張力が働く程度であれば良い。撥水性が弱すぎると形成されたスポットが基材表面で広がりすぎてしまい、生体物質固定後の特異的な反応や、発色させる反応を十分かつ均一に行う上で好ましくない。撥水性が強すぎると基材表面でスポットの位置が定まりにくく、また試料の注出量が多くなるので好ましくない。

【 0 0 1 5 】

なお本発明では、基材の撥水性は、基材表面において一様でなくても良く、例えば撥水性の弱い領域と、この領域を囲むように設けられる撥水性の強い領域とを基材表面に設けても良い。撥水性は、基材の材料や、疎水化又は親水化等の基材の表面処理によって調整することができる。

【 0 0 1 6 】

本発明に用いられる基材は、公知の材料で形成することができ、このような材料としては、例えばガラス、プラスチック、金属、セラミック等が挙げられる。本発明に用いられる基材は、生体物質を固定することができる材料で形成されていることが好ましく、このような材料としてはガラスやプラスチックが挙げられ、さらに成形の容易さの観点からプラスチックが特に好ましい。生体物質を十分に固定できない材料であっても、カルボジイミド樹脂等の樹脂化合物で表面を被覆することにより好適に用いることができる。

【 0 0 1 7 】

本発明では、マイクロピペットから所定量の試料を注出してマイクロピペットの注出口に試料の液滴を形成する工程と、注出口に形成された液滴が基材に接する位置にマイクロピペットを支持する工程とを含む。本発明は、これらの工程によって、注出口に形成した液滴を基材に移行させ、試料を基材に付着させる。本発明では、これらの工程の順序は特に限定されず、試料の液滴を形成した後にマイクロピペットを支持しても良いし、マイクロピペットを支持した後に試料の液滴を形成しても良いし、試料の液滴を形成しつつマイクロピペットを支持しても良い。

【 0 0 1 8 】

本発明では、マイクロピペットからの試料の注出量は、形成されるスポットの大きさや、試料及び基材の物性等の諸条件によって異なるが、一のマイクロピペットから注出される試料の注出量が $0.5 \sim 2.0 \mu\text{L}$ であることが、容易に目視できる直径 1 mm 程度のスポットを一滴の試料で効率よく形成する上で好ましい。

【 0 0 1 9 】

本発明では、マイクロピペットの支持位置は、試料の注出量や試料の物性等の諸条件によって異なり、所定量の注出終了時にマイクロピペットの注出口に形成された液滴が、注出口に付着した状態で基材表面に接する位置であれば特に限定されない。

【 0 0 2 0 】

本発明の実施の形態をより具体的に説明する。まず図 1 に示すように、マイクロピペットのノズル 1 の先端に開口する注出口 2 が基材 3 の表面から所定の距離だけ離れた位置となるようにマイクロピペットを支持し、試料の注出を開始する。注出される試料は、表面張力によりノズルの先端に張り付いており、注出口に付着している液滴を形成する。

【 0 0 2 1 】

設定された注出量の試料が注出されると、注出口 2 に形成される試料の液滴は、図 2 に示すように基材 3 に接する。マイクロピペットの支持位置は、前述したように、試料の注出完了後に調整しても良いし、それ以前に調整していても良い。

【 0 0 2 2 】

ノズル 1 の先端に形成された試料の液滴が基材 3 に接触すると、図 3 に示すように、液滴はノズル 1 から基材 3 へと移行する。ノズル 1 の先端と基材 3 との間隔は、前述したように、試料の注出量や試料の粘度、試料の表面張力、基材の撥水性等の各種物性により異なるので、これらの条件に応じて微調整を要することがある。

【 0 0 2 3 】

基材 3 に移行した液滴は、図 4 に示すように基材 3 の表面に広がり、この液滴を乾燥させることにより、試料中の生体物質が基材 3 の表面に固定され、スポットを形成する。

【 0 0 2 4 】

より具体的な条件を例示すると、例えば基材には日清紡績社製の C a r b o s t a t i o n (表面がカルボジイミド樹脂でコーティングされたスライドガラス) を用い、試料の溶媒には 6 × S S C (1 0 × S S C : 1 . 5 M 塩化ナトリウム、0 . 1 5 M クエン酸ナトリウム) を用い、生体物質には DNA を用い、試料中における生体物質の濃度 (DNA 濃度) を 0 . 1 p m o l / μ L とし、試料の注出量を 1 μ L としたときに、ノズル先端と基材との距離を 0 . 1 ~ 0 . 2 m m とすることで直径 1 m m のスポットが容易に得られる。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法により作製されたマイクロアレイには、目視で容易に確認できるスポットが形成される。このスポットは、蛍光の検出又は発色の確認等の公知の検出方法で検出することができる。本発明では、検出用の機器を必要とせず目視にて容易に検出できる観点から、発色による検出が好ましい。

【 0 0 2 6 】

なお、微小スポットが形成されたマイクロアレイを用いる生体物質の検出では、通常は基材としてスライドガラスが用いられる。これは主に、生体物質の検出時に蛍光スキャナから照射される紫外波長の光を吸収しないためである。

【 0 0 2 7 】

しかしながら本発明では、目視で容易に確認できる大きさのスポットを形成することができることから、生体物質の検出結果も目視で容易に確認できるので、発色試薬による検出を好適に採用することができる。したがって紫外波長の光を吸収する材料として採用が見合わされていたプラスチックを基材の材料として好適に用いることができる。

【 0 0 2 8 】

このように本発明では、容易に成形できるプラスチックを基材の材料として用いることができることから、従来より基材として用いられているスライドガラスのような平板状の形状とは異なる任意の形状の基材を用いることが可能である。このような任意の形状の基材としては、例えば立体的な形状の基材が挙げられ、具体例として図5に示すように、生体物質が固定される水平な底部及びこの底部の周縁に立設する壁部を有する容器状の試料固定部が所定の高さに支持されている形状の、反応容器を兼ねた形状の基材が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

【実施例】

以下に本発明の実施例を示す。

日清紡績製Carbostationを基材とし、図1から図4に示した先の実施の形態と同様に、DNA試料を基材に付着させ、マイクロアレイを作製した。DNA試料については、溶媒には6×SSCを用い、DNAには下記表1に示す配列番号1～4のDNAを用い、DNA濃度を0.1 pmol/μLに調整し

たものを用いた。図 6 中の DNA-1、5、6、10、及び 11 の位置には、配列番号 4 の DNA をスポットし、その他の位置には、下記表 1 に示す配列番号 1、2、及び 3 の DNA の中から任意に選択した DNA をスポットした。試料の付着には、自動分注装置としてパーキンエルマーライフサイエンス社製マルチプローブ II を用いた。注出口と基材との距離は 0.2 mm とし、注出口からの試料の注出量は 1 μ L とした。

DNA 試料の種類とその配置を図 6 に示す。

【0030】

DNA 試料を基材に付着させた後は、常法にしたがって DNA を基材に固定し、洗浄し、PCR 産物を含む溶液を基材表面に行き渡らせ、恒温器内にてハイブリダイズさせた。PCR 産物には、下記表 1 に示す配列番号 5 の DNA を用いて、PCR 法により、下記表 1 に示す配列番号 4 の DNA と相補的な配列を有する λ DNA 断片を増幅したものを用いた。なお、得られた断片をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により検出した結果、その断片は約 100 bp の長さのものであった。

【0031】

【表 1】

表 1		
配列番号	塩基配列	備考
配列番号 1	cct gtt ctg act gcc gtt tc	
配列番号 2	cct gtt ctg tct gcc gtt tc	
配列番号 3	cct gtt ctg gct gcc gtt tc	
配列番号 4	cct gtt ctg cct gcc gtt tc	
配列番号 5	agg ctg aga ttc cac gaa gc	5'-ビオチン化

【0032】

上記反応後に、マイクロアレイを洗浄して未反応物を除去し、ストレプトアビジン-ビオチン化 HRP (Horse Radish Peroxidase) Conjugate (製造元：特殊免疫研究所) を基材表面に展開し、30 分間室温で反応させた。その後、基材を TBS-T バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) に浸して振とうした。

【 0 0 3 3 】

次に、TMB S u b s t r a t e キット（フナコシ社製）を標準プロトコルどおりに調製し、これを基材表面に展開して30分間静置した。その後、マイクロアレイを蒸留水に浸して発色反応を停止させた。

【 0 0 3 4 】

前述した作業により、直径1mm程度の青色の発色スポットが得られた。発色後のマイクロアレイの様子を図7に示す。

【 0 0 3 5 】

【発明の効果】

本発明のマイクロアレイの作製方法は、マイクロピペットを有し、少なくともこのマイクロピペットの支持及びマイクロピペットに収容した液状の試料の注出、の各操作を自動的に行う自動注出装置を用いて、生体物質を含有する液状の試料を撥水性の基材に付着させ、付着させた試料を乾燥させて生体物質を基材に固定化するマイクロアレイの作製方法において、マイクロピペットから所定量の試料を注出してマイクロピペットの注出口に試料の液滴を形成する工程と、注出口に形成された液滴が基材に接する位置にマイクロピペットを支持する工程とを含み、注出口に形成した液滴を基材に移行させることにより試料を基材に付着させることから、マイクロピペットを有し微小なスポットを形成できる自動注出装置を用いて、容易に目視できる大きさのスポットを一滴の試料で形成することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明では、自動注出装置には複数のマイクロピペットを有する自動分注装置を用い、基材の複数箇所に試料を付着させると、複数のスポットを有するマイクロアレイを作製する上で、またマイクロアレイの作製からその後の生体物質の検出操作までを自動的に行う上でより一層効果的である。

【 0 0 3 7 】

本発明では、一のマイクロピペットから0.5～2.0 μ Lの試料を注出して液滴を形成すると、比較的少ない量の試料で、目視で容易に確認できるスポットを形成することができ、スポットを効率よく形成する上でより一層効果的である

。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施の形態において注出口に試料の液滴を形成する状態を示す概略図である。

【図 2】

本発明の実施の形態において注出口に形成された試料の液滴が基材表面に接する状態を示す概略図である。

【図 3】

本発明の実施の形態において試料の液滴が注出口から基材表面に移行した状態を示す概略図である。

【図 4】

本発明の実施の形態において試料の液滴が基材表面に付着した状態を示す概略図である。

【図 5】

本発明において好適の用いられる基材の一例を示す概略図である。

【図 6】

本発明の実施例において基材表面に固定された DNA 試料の配置を示す図である。

【図 7】

本発明の実施例においてスポットを青色に発色させたマイクロアレイの状態を示す図である。

【符号の説明】

- 1 ノズル
- 2 注出口
- 3 基材

【 0 0 3 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nisshinbo Industries, Inc.

<120> マイクロアレイの作製方法

<130> P-9938

<140>

<141> 2002-07-16

<160> 5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

cctgttctga ctgccgtttc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

cctgttctgt ctgccgtttc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

cctgttctgg ctgccgtttc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

cctgttctgc ctgccgtttc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

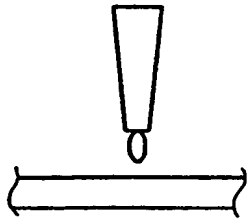
<400> 5

aggctcagat tccacgaagc

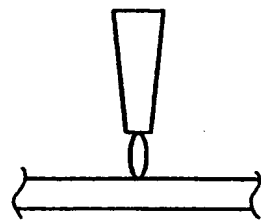
20

【書類名】 図面

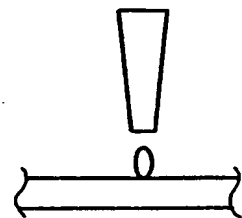
【図 1】



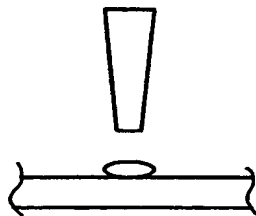
【図 2】



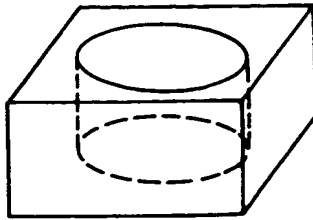
【図 3】



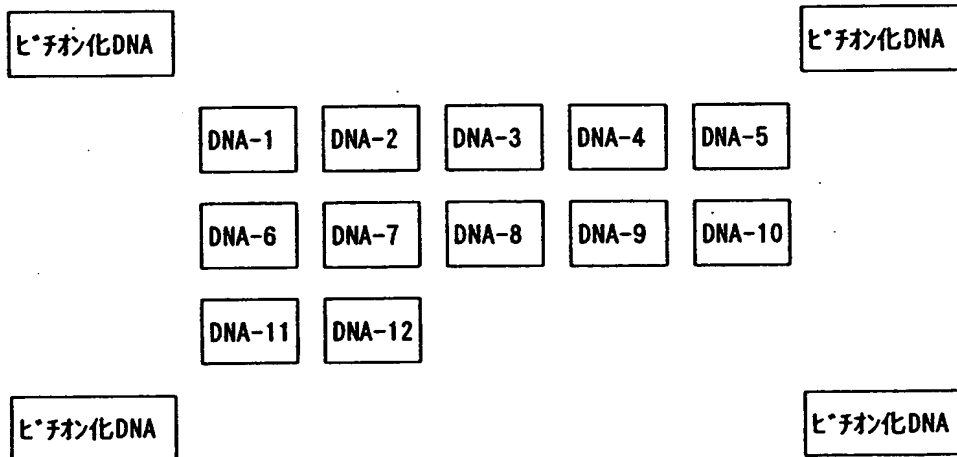
【図 4】



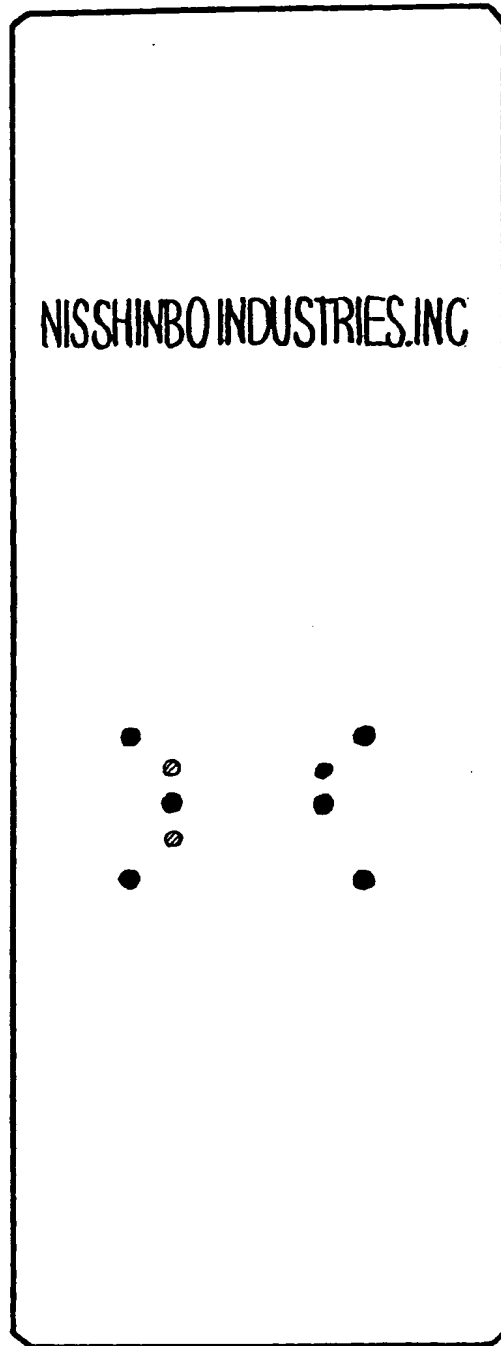
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マイクロピペットを有し微小なスポットを形成できる自動注出装置を用いて、容易に目視できる大きさのスポットを一滴の試料で形成する。

【解決手段】 マイクロピペットを有し、少なくともこのマイクロピペットの支持及びマイクロピペットに収容した液状の試料の注出、の各操作を自動的に行う自動注出装置を用いて、生体物質を含有する液状の試料を撥水性の基材に付着させ、付着させた試料を乾燥させて生体物質を基材に固定化するマイクロアレイの作製方法において、マイクロピペットから所定量の試料を注出してマイクロピペットの注出口に試料の液滴を形成する工程と、注出口に形成された液滴が基材に接する位置にマイクロピペットを支持する工程とを含み、注出口に形成した液滴を基材に移行させることにより試料を基材に付着させる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 4 3 7 4]

1. 変更年月日	1 9 9 3 年 3 月 3 0 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号
氏 名	日清紡績株式会社